

(19)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

(11)

Veröffentlichungsnummer:

**0 386 734  
A2**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21)

Anmeldenummer: 90104353.9

(51)

Int. Cl.<sup>5</sup>: C07K 15/04, C12P 21/08,  
C12Q 1/70, A61K 39/12

(22)

Anmeldetag: 07.03.90

(30)

Priorität: 10.03.89 DE 3907721

(43)

Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
12.09.90 Patentblatt 90/37

(84)

Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE DK ES FR GB IT LI LU NL SE

(71)

Anmelder: BEHRINGWERKE  
Aktiengesellschaft  
Postfach 1140  
D-3550 Marburg 1(DE)

(72)

Erfinder: Bartsch, Dusan, Dr.  
St. Annagasse 12  
D-6900 Heidelberg(DE)  
Erfinder: Glissmann, Lutz, Dr., Prof.  
Pirrollweg 1  
D-6908 Wiesloch(DE)  
Erfinder: Müller, Martin  
Husarenstrasse 14  
D-6900 Heidelberg(DE)

(74)

Vertreter: Klein, Otto, Dr. et al  
Hoechst AG Zentrale Patentabteilung  
Postfach 80 03 20  
D-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

(94)

Immunogene Regionen auf dem E-7-Protein des Humanen Papillomvirus Typ 16.

(97)

Die Erfindung beschreibt zwei immunogene Regionen des E7-Proteins von Humanen Papillomvirus Typ 16 (HPV 16), wobei die eine Immunreaktive Region stromabwärts von Nukleotid 595 und die andere stromabwärts von Nukleotid 667 des HPV 16 Genoms lokalisiert ist.

EP 0 386 734 A2

## Immunogene Regionen auf dem E7-Protein des Humanen Papillomvirus Typ 16

Die Erfindung betrifft zwei immunogene Regionen auf dem Humanen Papillomvirus Typ 16 (HPV 16) E7-Protein, wobei die eine Immunreaktive Region 3' zu der Nukleotidposition 595 und die andere 3' zu der Nukleotidposition 667 des HPV 16 Genoms lokalisiert ist.

Papillomviren lassen sich nicht in Kultur vermehren. Die Verwendung der HPV-DNA als Diagnostikum sowie die Gewinnung der Expressionsprodukte, deren Verwendung als Antigene, die Isolierung von Antikörpern und die Herstellung entsprechender Diagnostika setzt somit gentechnische Verfahren voraus.

Dürst et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983) 3813 -3815 beschreiben einen neuen Typ von menschlichen Papillomviren (HPV), den sie als HPV 16 bezeichnen. Die DNA-Sequenz und die Genom-Organisation dieses Virus sind in Seedorf et al., Virology 145 (1985) 181 - 185 wiedergegeben.

Smotkin und Wettstein, Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 4680 -4684 (1986) identifizierten das E7-Transkript als das am häufigsten vorkommende HPV-Transkript in der CaSki Zelllinie bzw. einem anderen Zervix-Karzinom, das HPV 16 DNA hauptsächlich als Plasmid enthält. Seedorf et al, EMBO J. 6, 139 - 144 (1987) zeigten dann, daß das E7-Protein das am häufigsten vorkommende virale HPV 16 Protein in solchen Zelllinien ist, die HPV 16 in integrierter Form oder als Plasmid enthalten.

Das E7-Protein scheint darüberhinaus eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des transformierten Phänotyps zu spielen. Weiterhin treten Antikörper gegen E7 Protein gehäuft bei Patienten mit Zervix-Karzinom auf. Der Nachweis von HPV 16 E7 Protein bzw. der dagegen gerichteten Antikörper ist deshalb von Interesse in der Diagnostik.

Bei der Analyse einer "shot gun" Expressionsbank klonierter HPV 16 DNA mit einem polyklonalen Antiserum gegen HPV16 E7 von Kaninchen wurden zwei immunreaktive Regionen innerhalb des E7-Proteins gefunden. Die erste Region liegt im N-terminalen Bereich von E7 und wird durch vier verschieden große Phagenklone repräsentiert:

I. 5'-ATG TTA GAT TTG CAA CCA GAG ACA ACT GAT CTC TAC TGT TAT GAG CAA-3'

II. 5'-ATG TTA GAT TTG CAA CCA GAG ACA ACT GAT CTC TAC

III. 5'-ATG TTA GAT TTG CAA CCA GAG ACA ACT

IV. 5'-ATG TTA GAT TTG CAA CCA GAG ACA

Dabei entspricht das 5'-Ende der Klone der Nukleotidposition 595 auf dem HPV 16 Genom

Entsprechend ist die Aminosäuresequenz der

vier Klassen:

I. met leu asp leu gln pro glu thr thr asp leu tyr cys tyr glu gln

II. met leu asp leu gln pro glu thr thr asp leu tyr

III. met leu asp leu gln pro glu thr thr

IV. met leu asp leu gln pro glu thr

Die zweite immunreaktive Region von HPV 16 E7 wurde bei Nukleotidposition 667 auf dem HPV 16 Genom lokalisiert:

5'-GAT GAA ATA GAT GGT CCA GCT GGA CAA GCA GAA CCG GAC AGA GCC CAT TAC-3'

und enthält die 17 Aminosäuren:

asp glu ile asp gly pro ala gly gln ala glu pro asp arg ala his tyr

Die Erfindung betrifft folglich die o.g. beiden immunreaktiven Regionen, ihre Verwendung für Diagnostik, Therapie und als Arzneimittel bzw. Vakzine.

Die Erfindung ist ferner in den Beispielen und Patentansprüchen enthalten.

### Beispiele:

#### 1. Herstellung der "shotgun"-Expressionsbank des HPV 16 Genoms.

Die im Bakterienplasmidvektor sp65 klonierte HPV 16 DNA wurde mit Ultraschallscherung und anschließender DNase I Behandlung auf eine durchschnittliche Fragmentgröße von etwa 100 Basenpaaren (bp) gebracht.

Die Enden dieser Fragmente wurden mit Hilfe von T4 DNA Polymerase und E.coli DNA Ligase aufgefüllt. Der Phagenexpressionsvektor fd-tet-J6 wurde mit PVU II geschnitten und die Fragmente "blunt" einligiert. fd-tet-J6 ist von dem Bacteriophagen fd abgeleitet und von G. P. Smith, Science 228, 1315 - 1317 (1985) beschrieben worden.

#### 2. Nachweis von immunogenen Reaktionen

Nach Ausplattieren der rekombinanten Phagen auf E.coli K91 wurden Replika auf Nitrocellulosefilter mit spezifischen Seren auf immunreaktive Phagen untersucht. 200 Rekombinanten reagierten mit dem Antiserum; 30 davon wurden mittels DNA-Sequenzanalyse weiter untersucht. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

1. Alle Rekombinanten enthalten E7-spezifische Sequenzen.

2. Innerhalb des E7-Proteins wurden zwei

immunogene Regionen gefunden. Die erste Region wurde mittels 25 überlappender Klone identifiziert. Diese 25 Klone konnten in 4 Klassen eingeteilt werden:

I. 5'-ATG TTA GAT TTG CAA CCA GAG  
ACA ACT GAT CTC TAC TGT TAT GAG CAA-3'

II. 5'-ATG TTA GAT TTG CAA CCA GAG  
ACA ACT GAT CTC TAC

III. 5'-ATG TTA GAT TTG CAA CCA GAG  
ACA ACT

IV. 5'-ATG TTA GAT TTG CAA CCA GAG  
ACA

Dabei entspricht das 5'-Ende der Klone der Nukleotidposition 595 auf dem HPV 16 Genom.

Entsprechend ist die Aminosäuresequenz der vier Klassen:

I. met leu asp leu gln pro glu thr thr asp leu  
tyr cys tyr glu gln

II. met leu asp leu gln pro glu thr thr asp leu  
tyr

III. met leu asp leu gln pro glu thr thr

IV. met leu asp leu gln pro glu thr

Die minimale Größe dieser Region beträgt also 8 Aminosäuren. Da monoklonale Antikörper nur gegen Klasse I und II reagierten, das polyklonale Antiserum aber gegen alle 4 Klassen reagierte, sind mindestens 2 verschiedene Epitope auf dem Antigen der Klasse I bzw. II lokalisiert.

Entsprechend der Aminosäuresequenz der Klasse II wurde ein synthetisches Oligopeptid (met-leu-asp-leu-gln-pro-glu-thr-thr-asp-leu-tyr) im ELISA verwendet und zeigte deutliche Reaktion mit dem erwähnten polyklonalen Kaninchenserum gegen HPV 16 E7.

Die zweite immunreaktive Region von 17 Aminosäuren wurde in 5 Klonen aufgefunden und bei der Nukleotidposition 667 auf dem HPV 16 Genom lokalisiert:

5'-GAT GAA ATA GAT GGT CCA GCT GGA CAA  
GCA GAA CCG GAC AGA GCC CAT TAC-3'

entsprechend den 17 Aminosäuren

asp glu ile asp gly pro ala gly gln ala glu pro asp  
arg ala his tyr

## Ansprüche

1. Immunogene Region von HPV16 E7-Protein, gekennzeichnet durch eine der Aminosäuresequenzen

I. met leu asp leu gln pro glu thr thr asp leu  
tyr cys tyr glu gln

II. met leu asp leu gln pro glu thr thr asp leu  
tyr

III. met leu asp leu gln pro glu thr thr

IV. met leu asp leu gln pro glu thr

V. asp glu ile asp gly pro ala gly gln ala glu  
pro asp arg ala his tyr

2. Vakzine, die mindestens ein Peptid der immunogenen Regionen nach Anspruch 1 enthält.

3. Diagnostika zum Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen HPV 16 E7-Proteine, gekennzeichnet durch einen Gehalt von mindestens einer der Aminosäuresequenzen nach Anspruch 1.

4. Poly- oder monoklonale Antikörper, die gegen mindestens eine immunogene Region nach Anspruch 1 gerichtet sind.

5. Diagnostikum, das poly- oder monoklonale Antikörper nach Anspruch 4 enthält.

Patentansprüche für folgenden Vertragsstaat: ES

1. Verfahren zur Herstellung einer Vakzine gegen HPV, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Peptid enthaltend eine der Aminosäuresequenzen

I. met leu asp leu gln pro glu thr thr asp leu tyr cys  
tyr glu gln

II. met leu asp leu gln pro glu thr thr asp leu tyr

III. met leu asp leu gln pro glu thr thr

IV. met leu asp leu gln pro glu thr

V. asp glu ile asp gly pro ala gly gln ala glu pro  
asp arg ala his tyr

mit geeigneten Trägermaterialien versetzt werden.

2. Verfahren zur Herstellung von Diagnostika, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Peptid mit einer der in Anspruch 1 genannten Aminosäuresequenzen eingesetzt wird.

3. Verfahren zur Herstellung von poly- oder monoklonalen Antikörpern, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Peptid mit einer der in Anspruch 1 genannten Aminosäuresequenzen zur Immunisierung verwendet wird.

4. Verfahren zur Herstellung von Diagnostika, dadurch gekennzeichnet, daß nach Anspruch 3 hergestellte poly- oder monoklonale Antikörper verwendet werden.